

Evolutional and physiological analysis of the blue light receptor of photosynthetic stramenopiles.

著者	石川. 美恵
号	8
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第184号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60056

いしかわ えみ

氏名（本籍地）	石川 美恵
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第184号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）分子生命科学専攻
論文題目	Evolutional and physiological analysis of the blue light receptor of photosynthetic stramenopiles.（黄 色植物の青色光応答反応とその光受容体の進化）
博士論文審査委員	（主査） 教授 草野 友延 教授 高橋 秀幸 准教授 日出間 純

論文内容の要旨

動物が最適な環境を求め移動しながら生活するのに対し、植物は、土壌に定着して一生を過ごす。移動することができない植物は、光合成効率を上げるために、光屈性、光形態形成や葉緑体光定位運動といった独自の光運動反応（光応答反応）を行っている。これらの光応答反応は、おもに青色光を利用している。陸上には、様々な波長の光が届くが、海の中には青色光しか届かない。このことは、生命誕生の直後から青色光を生物が利用してきたことを示唆する。

様々な生物において、青色光による光応答反応が生理学的に解析される一方、その光受容体の実体は長い間不明だった。1993年に、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の突然変異体の解析から最初の青色光受容体としてクリプトクロム(Cryptochrome)が単離された。その後、光屈性や葉緑体光定位運動の青色光受容体としてフォトトロピン(Phototropin)が単離され、その機能解析が進んできている。

一方、水圏で生活する藻類では、ミドリムシ(*Euglena*)の光驚動反応、フシナシミドロ(*Vaucheria*)の光屈性、葉緑体光定位運動やヒバマタ(*Fucus*)受精卵の極性誘導反応などに青色光が関与していることが明らかになっている。これらの生物は、シロイヌナズナを含む多くの陸上植物とは進化的に全く異なっている。陸上植物はシアノバクテリアを取り込んで葉緑体とした一次共生植物である。一方、フシナシミドロを含む黄色植物やミドリムシは、祖先真核生物が一次共生植物を取り込んで成立した二次共生植物である。これらの二次共生植物では、クリプトクロムやフォトトロピンが単離されておらず、その青色光受容体はフシナシミドロから青色光受容体オーレオクロム(Aureochrome)が単離されるまで不明であった(Takahashi et al. 2007)。オーレオクロムはN末端側に転写因子であるbZIPドメイン、C末端側に光受容のためのLOVドメインをもち、フシナシミドロ光形態形成反応の受容体であることが明らかになっている。しかし、フシナシミドロ以外の生物でのオーレオクロムの存在の有無は全くわかっていなかった。

そこで本論文では、まずフシナシミドロを含む黄色植物の系統的特異性に注目し、第一章でこれらの生物群でのオーレオクロムの有無と系統関係を明らかにし、続く第二章では、第一章で単離したオーレオクロムの分光学的解析を行い、それが青色光受容体として機能するかを明らかにした。第三章では、単細胞性のオクロモナス(*Ochromonas danica*)と多細胞性のヤハズグザ(*Dictyopteris latiuscula*)を用い、それらの光応答反応を解析した。

第一章では、1) 黄色植物の褐藻綱ヒバマタ(*Fucus distichus* ssp. *evanescens*)、黄金色藻綱オクロモナスとラフィド藻綱シャトネラ(*Chattnella antiqua*)からオーレオクロムのオルソログを単離した。2種のケイ藻ゲノム、ペラゴ藻オーレオコッカス(*Aureococcus anophagefferens*)からもオーレオクロムのオルソログと考えられる配列を得た。一方、2) 黄色植物の近縁生物である卵菌綱ミズカビ(*Saprolegnia ferax*)、黄色植物と同じ二次共生植物である、ハプト植物プリムネシウム(*Prymnesium parvum*)、クリプト植物クリプトモナス(*Cryptomonas tetrapyrenoidosa*)と、これらの葉緑体の起源とされる紅色植物ポルフィリディウム(*Porphyridium*

purpureum)からはオーレオクロムが検出されなかった。さらに、単離したオーレオクロムの LOV ドメインと既知の LOV ドメインを用いた系統解析を行い、LOV ドメインの進化を検討した。3) オーレオクロムの LOV ドメインは、陸上植物のフォトトロピンや機能未知の PASLOV タンパク質、菌類の LOV ドメインとは独立に進化したことが示唆された。

第二章では単離したオーレオクロム遺伝子の発現コンストラクトを作成し、それを大腸菌内で発現させ、その光受容能を確認した。その結果、1) 大腸菌内で、少なくともオクロモナスのオーレオクロム 1 およびヒバマタオーレオクロム 2 はフラビンを経結合した。また、オクロモナスオーレオクロム 1 タンパク質を精製し、その分光学的特徴を検討したところ、2) オクロモナスオーレオクロム 1 は 423、447、472 nm にピークをもつ吸収スペクトルを示した。3) また

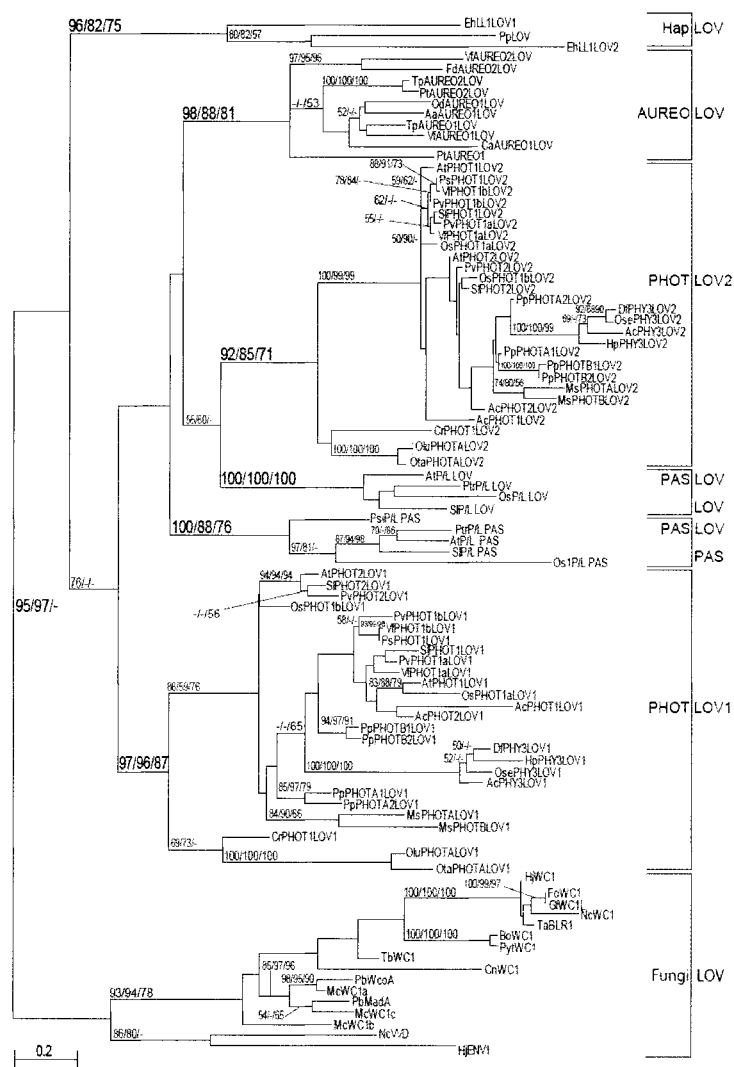


図 1 真核生物の LOV ドメインを用いた最尤系統樹

青色光照射によって、これら三つのピークは減少し、390 nm 付近の吸収が上昇した。これらの特徴は、既に知られている多くのフラビン結合性の LOV を持つ光受容体の特徴と一致する。少なくともオクロモナスオーレオクロム 1 は、青色光受容能をもち、光受容体として機能すると考えることができる。

第三章では、オクロモナスオーレオクロムが実際に制御する光応答反応が何であることを明らかにするため、その光応答反応を解析した。顕微鏡観察下で光を照射すると、オクロモナスは光スポットへ集まってくる（光集合）。異なる波長の光（青色光、緑色光、赤色光）で、その反応性を調べたところ、1) 照射 30 分で、どの光でもオクロモナスは光集合を起こした。また、細胞形態への影響を調べると、2) 白色光に比べて暗黒下の細胞の方がわずかに大きくなった。通常、オクロモナスは楕円形または水滴形をしているが、3) 青色光、緑色光に比べて赤色光下の細胞の方が、より円形に近くなった。これらの形態の変化は、特定の波長の光によって細胞の形が制御されるため起こるのか、そもそもオクロモナスの運動性が変化する、すなわち赤色光に比べて青色光の方がオクロモナスの運動性が高くなる、ために起こるのかは今後検討の余地がある。最後に、黄色植物の中でも最も体制が複雑に進化している褐藻ヤハズグザ (*Dictyopteris latiuscula*) の形態形成反応への光の影響を解析した。ヤハズグザを青色光、緑色光、赤色光下でそれぞれ培養すると、1) 青色光と緑色光では葉状体を形成し、2) 赤色光では無色透明な毛を形成した。3) 光強度が上昇するにつれて (0.2, 2, 20 $\mu\text{mole/m}^2/\text{s}$)、これら葉状体または毛の形成数は増加した。毛は仮根に似ているが、その形態と機能について詳しい事は明らかになっていない。オクロモナス、ヤハズグザの光応答反応とオーレオクロムや他の光受容体の関連性に関しては、本研究から十分な根拠は得られなかった。今後さらに詳細に解析することで黄色植物の青色光反応とオーレオクロムの関連性が明らかにして行けると考えている。

本論文において、オーレオクロムが光合成を行う黄色植物のみに系統特異的に保存されていること、少なくともヒバマタとオクロモナスのオーレオクロムのうち最低一つは青色光の受容体として機能することが明らかになった。第三章のオクロモナスとヤハズグザの光応答反応は、直接オーレオクロムとつながる根拠はみつからなかったが、黄色植物の光応答反応に新たな知見を加えた。今後は、オーレオクロムタンパク質自体の解析と黄色植物の光応答反応を並行して解析していくことで、ヒバマタ極性誘導反応とオーレオクロムの関与を明らかにして行けると考えている。

論文審査結果の要旨

黄色植物に特有の新奇の青色光受容体オーレオクロムが 2007 年に発見された。オーレオクロムは青色光によって活性化される転写因子であった。当時修士課程だった石川も褐藻ヒバマタ (*Fucus*) からオーレオクロムのオルソログを発見し、この発見に大きな貢献をしている。

石川の博士課程の研究目的はつぎのとおりである。1) オーレオクロムの進化と系統を探索するため、褐藻やケイ藻の属するストラメノパイル (stramenopile) の代表的な属、および近縁の二次細胞共生生物群でオーレオクロムを探索し、オルソログを単離、全長配列を決定し、その系統関係を明らかにする。2) ヒバマタはじめ、いくつかの生物のオーレオクロム遺伝子を大腸菌で発現させ、精製したオーレオクロムタンパクが青色光受容体として機能することを確認する。3) オーレオクロムがストラメノパイルでどのような機能を持っているのかを知るために、生態的にも、食品や医薬品としても重要な褐藻の青色光反応を探索し、オーレオクロムの標的反応を同定する。

1) については RT-PCR を用いたクローニングと DNA データベースを BLAST して得た配列を比較した結果、光合成をするストラメノパイル (黄色植物という) にのみオーレオクロムが保存されていることを発見した。さらに青色光センサー LOV ドメインについて系統樹を求め、全ての黄色植物のオーレオクロムは単一クレードに含まれること、オーレオクロムは緑色植物に特異的なフォトトロピン (PHOT) の LOV 2 ドメインと祖先を共有することが推定された。この発見は Planta(2009)に発表され、真核生物の光反応の進化を考える上で貴重な発見であると高く評価されている。

2) は石川が、博士課程前期からの指導教員片岡准教授の定年退職 (2010 年 3 月) 後、日本学術振興会特別研究員にかかる「優秀若手研究者海外派遣事業」に採択され、ドイツ Mühlheim のマックスプランク研究所の W. Gärtner 博士のもとで 7 ヶ月余おこなった研究である。黄金色藻 *Ochromonas* から OdaAURE01 とヒバマタから FdaAURE02 の全長タンパクの発現に成功し、それらが青色光を吸収して FMN と共有結合を作ることを確認した。これは、オーレオクロムがこれらの黄色植物で光受容体として機能することを強く示唆する。現在、これらを結晶化し、タンパク構造を解明する共同研究が発足している。

3) オーレオクロムの標的反応を探すには、ヒバマタ受精卵の極性誘導のような光形態形成反応に焦点を絞るのが得策である。しかし、ヒバマタ受精卵は 1 年の内数週間しか得られず、室内培養もできないので、実験材料としては不適である。培養の可能な小型褐藻で、粘液の少ないものを探し求めた結果、神戸大学で保存培養されているヤハズグサ (*Dictyopteris*) に行き着いた。粘液の多いものは DNA 抽出も困難である。限られた実験条件と短い期間での本研究は未熟で予行的ではあるが、青色光と緑色光はヤハズグサの枝状葉状体の分化に必要であるという重要な知見を得ている。緑色光の効果はおそらく青色光受容体を介したものと推定される。赤色光は仮根様の毛を藻体基部に誘導したが、光制御機構についてはさらに検討を要するが、褐藻の光生物学の基礎的知見となり得るであろう。

以上のことは、石川美恵が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、石川美恵提出の論文は、博士 (生命科学) の博士論文として合格と認める。